

DOCKET NO.: 214896US0PCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: BONNIN Estelle et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR00/00966

INTERNATIONAL FILING DATE: April 14, 2000

FOR: METHOD FOR OBTAINING A. NIGER CULTURES AND THEIR USES FOR  
PRODUCING FERULIC ACID AND VANILLIC ACID

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<b><u>COUNTRY</u></b>	<b><u>APPLICATION NO</u></b>	<b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b>
France	99 04644	14 April 1999

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR00/00966. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 1/97)



PCT/FR 00 / 00966



FR 00 / 966  
EJU

REC'D 15 MAY 2000

WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 02 MAI 2000

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cedex 06  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 37



**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **14. AVR. 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **99 04644 -**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**  
DATE DE DÉPÔT **14 AVR. 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET ORES  
6 avenue de Messine  
75008 PARIS

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone  
MJPCb539/90FR

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire  
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale ☐ brevet d'invention ☐ certificat d'utilité n°

Etablissement du rapport de recherche ☐ diffère ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCEDE D'OBTENTION DE CULTURES D'A. NIGER ET LEURS UTILISATIONS POUR LA PRODUCTION D'ACIDE FERULIQUE ET D'ACIDE VANILLIQUE

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA

Forme juridique  
Etablissement public

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

147 rue de l'Université  
75338 PARIS CEDEX 07

Pays  
FRANCE

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES ☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)

VIALLE-PRESLES Marie-José (n° 93-2009)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

## DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

### DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 04 644

### TITRE DE L'INVENTION :

PROCEDE D'OBTENTION DE CULTURES D'A. NIGER ET LEURS UTILISATIONS POUR  
LA PRODUCTION D'ACIDE FERULIQUE ET D'ACIDE VANILLIQUE

### LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET ORES

6 avenue de Messine

75008 PARIS

### DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- BONNIN Estelle  
8 rue Aimé Penel, 44700 ORVAULT, FRANCE
- LESAGE-MEESSEN Laurence  
7 parc de la Serane, 13008 MARSEILLE, FRANCE
- STENTELAIRE Christelle  
9 allée du Fouis, Les Terrasses des Cadenières, 13127 VITROLLES, FRANCE
- ASTHER Marcel  
28 avenue du Peymian, 13600 LA CIOTAT, FRANCE
- THIBAUT Jean-François  
2 rue de la Rotonde, 44700 ORVAULT, FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 14 avril 1999

VIALLE-PRESLES Marie-José (n° 93-2009)

PROCÉDÉ D'OBTENTION DE CULTURES D'A. NIGER ET LEURS  
UTILISATIONS POUR LA PRODUCTION D'ACIDE FÉRULIQUE ET  
D'ACIDE VANILLIQUE

La présente Invention est relative à  
5 l'obtention d'acide férulique et d'acide vanillique par  
bioconversion.

La vanilline, qui est actuellement l'arôme le  
plus utilisé dans les industries agro-alimentaires, peut  
avantageusement être produite par bioconversion d'acide  
10 férulique ou d'acide vanillique (qui est lui-même un  
produit de bioconversion de l'acide férulique), à l'aide  
de champignons filamenteux.

Ainsi, la Demande de brevet européen 453 368  
au nom de la Société PERNOD-RICARD, décrit la production  
15 de vanilline naturelle par bioconversion d'acide  
férulique ou d'acide vanillique, en présence d'un  
champignon filamenteux du groupe des Basidiomycètes,  
*Pycnoporus cinnabarinus*. La Demande PCT WO/96/08576 au  
nom de l'INRA, décrit un procédé de bioconversion en 2  
20 étapes, permettant d'obtenir un rendement plus élevé.  
Dans la première étape, l'acide férulique est converti en  
acide vanillique par un champignon filamenteux  
(Ascomycète, Basidiomycète ou Actinomycète) ; l'acide  
vanillique obtenu est ensuite converti en vanilline par  
25 un Basidiomycète.

L'acide férulique, qui constitue le produit de  
départ de ces procédés de bioconversion, est l'un des  
composés phénoliques majeurs de la paroi cellulaire des  
végétaux. Il a été décrit chez les monocotylédones,  
30 notamment les céréales (blé, maïs,...), ainsi que chez  
les dicotylédones de la famille des Chénopodiacees  
(betterave, épinard,...). Il est généralement estérifié  
aux polysaccharides de la paroi végétale, par  
l'intermédiaire de l'arabinose ou du galactose dans les  
35 pectines de betterave, ou de l'arabinose dans les  
arabinoxylanes de céréales.

L'acide férulique est présent dans divers co-produits agricoles : par exemple, les sons de blé (résidus de la meunerie) et de maïs (résidus de la semoulerie) et les pulpes de betterave (résidus de l'industrie du sucre), contiennent de 0,6 à 4% d'acide férulique. Ces produits constituent des sources potentielles facilement disponibles et peu coûteuses d'acide férulique.

Bien qu'il soit théoriquement envisageable, dans le cadre de la mise en œuvre des procédés de bioconversion décrits dans la Demande EP 0 453 368 ou la demande PCT WO/96/08576 de produire de l'acide vanillique directement à partir d'acide férulique estérifié aux polysaccharides, le taux de bioconversion dans ces conditions est négligeable.

L'acide férulique doit donc être préalablement libéré par des férulate estérases. Selon la nature du polysaccharide portant l'acide férulique, la liaison acide férulique-ose est différente : l'acide férulique forme une liaison ester avec le O-5 de l'arabinose dans les arabinoxylanes de céréales, alors que dans le cas des pectines de betterave, l'acide férulique est porté soit par le O-2 de l'arabinose, soit dans une moindre mesure par le O-6 du galactose. La libération de l'acide férulique impliquera donc des enzymes différentes selon la nature de la liaison à rompre : les principales férulate estérases mises en évidence chez *A. niger* sont indiquées dans le Tableau I ci-dessous.

Tableau I

Enzyme	Origine	Substrat préférentiel
FAE I	<i>Aspergillus niger</i>	arabinose féruloylé en O-2 /galactose féruloylé en O-6
FAEII	<i>Aspergillus niger</i>	arabinose féruloylé en O-5
FAEIII	<i>Aspergillus niger</i>	arabinose féruloylé en O-5
CinnAE	<i>Aspergillus niger</i>	arabinose féruloylé en O-2

En outre, les férulate estérases n'agissent pas directement sur les polysaccharides des parois végétales : les liaisons existant entre les oses au sein des polysaccharides pariétaux doivent préalablement être



rompues pour que l'acide férulique puisse être libéré par les férulate estérases. Etant donné la diversité des polysaccharides pariétaux, la rupture de ces liaisons nécessite un grand nombre d'activités enzymatiques différentes dont les principales sont : polygalacturonase, rhamnogalacturonase, arabinanase, galactanase, xylanase et glucanase. Les produits d'hydrolyse libérés par ces enzymes sont à leur tour dégradés par des osidases (arabinofuranosidase et galactosidase) et l'acide férulique est libéré par des férulate estérases.

Des mélanges enzymatiques permettant de libérer l'acide férulique présent dans les polysaccharides pariétaux des pulpes de betterave ou des sons de céréales sont commercialisés. Toutefois, ces mélanges enzymatiques n'ont pas une activité férulate estérase suffisante, et doivent être supplémentés en férulate estérases extraites de milieux de culture microbiens. En outre, une fois l'acide férulique libéré, sa purification implique de nombreuses étapes, longues et coûteuses, de séparation liquide/solide et liquide/liquide.

Or les Inventeurs sont maintenant parvenus à induire chez *Aspergillus niger* la production d'enzymes à large spectre d'activité, permettant non seulement une libération efficace de l'acide férulique, mais en outre la production directe d'acide vanillique naturel à partir de co-produits agricoles.

La présente invention a pour objet un procédé d'obtention de cultures d'*Aspergillus niger* à large spectre d'activité enzymatique, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'au moins une souche d'*Aspergillus niger* en présence d'au moins une source carbonée inductrice choisie dans le groupe constitué par :

- la pulpe de betterave ou au moins une de ses fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés, susceptibles d'être obtenues par hydrolyse acide ;
- un son de céréale, notamment de maïs, ou un mélange de sons de différentes céréales, ou au moins une de ses fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés, susceptibles d'être obtenues par autoclavage dudit son ou dudit mélange.

10 Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, ladite source carbonée inductrice est présente dans ledit milieu de culture à une concentration comprise entre 1 et 50 grammes (poids sec), et de préférence entre 2,5 et 30 grammes par litre de milieu de culture.

15 Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, la culture d'*Aspergillus niger* comprend au moins la souche CNCM I-1472, déposée le 31 août 1994 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes, 26 rue du Docteur Roux, Paris).

La présente invention a aussi pour objet :

- un procédé d'obtention d'une préparation enzymatique à large spectre d'activité, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'au moins une souche d'*Aspergillus niger* selon le procédé défini ci-dessus, et la récupération du surnageant de culture ;

- une préparation enzymatique susceptible d'être obtenue par ledit procédé.

La récupération du surnageant de culture peut s'effectuer par tous moyens connus en eux-mêmes, tels que centrifugation ou filtration, qui permettent de séparer les cellules d'*Aspergillus niger* du milieu de culture. Une préparation enzymatique conforme à l'invention peut être constituée par le surnageant lui-même, ou par un concentré dudit surnageant, obtenu par exemple par ultrafiltration ou par lyophilisation.

La présente invention a aussi pour objet un procédé de production d'acide férulique libre à partir d'un substrat féruloilé, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact dudit substrat  
5 avec au moins une culture d'*Aspergillus niger* préalablement obtenue selon le procédé conforme à l'invention, ou avec au moins une préparation enzymatique conforme à l'invention, dans des conditions permettant la libération de l'acide férulique par les enzymes présentes  
10 dans ladite culture ou ladite préparation enzymatique.

Au sens de la présente invention, on entend par : « substrat féruloilé », tout produit contenant ou constitué par au moins un polysaccharide féruloilé et/ou au moins un oligosaccharide féruloilé. Il s'agit  
15 notamment de tout substrat d'origine végétale comprenant des polysaccharides pariétaux féruloilés et/ou des oligosaccharides féruloilés.

Dans le cas où le substrat végétal comprend principalement des polysaccharides pariétaux insolubles,  
20 on pourra avantageusement les rendre plus accessibles à l'hydrolyse enzymatique, en les soumettant préalablement à un traitement chimique tel qu'une hydrolyse acide ou alcaline, et/ou à un traitement physique tel que l'autoclavage ou la cuisson-extrusion.

25 A titre de substrats végétaux particulièrement avantageux pour la mise en œuvre de la présente invention, on citera notamment :

- de la pulpe de betterave ou ses fractions solubles riches en oligosaccharides féruloilés, susceptibles  
30 d'être obtenues par hydrolyse acide ;
- un son de céréale, notamment de maïs, ou un mélange de sons de différentes céréales, ou leurs fractions solubles riches en oligosaccharides féruloilés, susceptibles d'être obtenues par autoclavage.

35 La mise en contact du substrat féruloilé avec au moins une souche d'*Aspergillus niger* préalablement

cultivée conformément à l'invention peut s'effectuer en ajoutant au milieu de culture d'*Aspergillus niger* une quantité dudit substrat féruloyle correspondant par exemple à un apport de 0,1 à 50 g d'acide férulique par litre de milieu de culture. De préférence, la quantité de substrat féruloyle ajoutée au milieu de culture correspond à un apport de 1 à 20 g, et avantageusement à un apport de 5 à 15 g d'acide férulique par litre de milieu de culture.

La mise en contact du substrat féruloyle avec au moins une préparation enzymatique conforme à l'invention peut s'effectuer en mélangeant ladite préparation enzymatique avec ledit substrat féruloyle, par exemple dans des proportions correspondant à un apport, par ledit substrat, de 0,1 à 40 g d'acide férulique pour 1 gramme de protéines totales de préparation enzymatique. De préférence, les proportions du mélange correspondent à un apport de 0,2 à 10 g et avantageusement de 0,5 à 5 g d'acide férulique, pour 1 gramme de protéines totales de la préparation enzymatique.

La quantité de substrat féruloyle ajoutée au milieu de culture ou à la préparation enzymatique varie notamment en fonction de la nature dudit substrat et de sa teneur initiale en acide férulique estérifié. Cette teneur peut être facilement déterminée par toute méthode connue en elle-même de l'homme de l'art, par exemple par la méthode décrite par SAULNIER et al. [Carbohydrate Research, 272, 241-253, (1995)].

Ledit substrat féruloyle peut être ajouté en une seule fois, en plusieurs fois par ajouts successifs, ou bien en continu.

Avantageusement, pour la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention, on utilisera une culture d'*Aspergillus niger* ou une préparation enzymatique produites en présence d'une source carbonée inductrice

comprenant de la pulpe de betterave ou au moins une de ses fractions riches en oligosaccharides féruloylés susceptibles d'être obtenues par hydrolyse acide, et un substrat féruloylé comprenant au moins un son de céréale, 5 notamment de maïs, ou au moins une de ses fractions riches en oligosaccharides féruloylés, obtenues par autoclavage.

L'acide férulique produit dans ces conditions peut, si on le souhaite, être recueilli à partir du 10 milieu de culture. Cependant, il est particulièrement avantageux d'effectuer directement la bioconversion de l'acide férulique en acide vanillique, par la même culture d'*Aspergillus niger*, dont les cellules possèdent les enzymes intracellulaires nécessaires à cette 15 bioconversion.

L'acide férulique ou l'acide vanillique obtenus conformément à l'invention pourront être utilisés tels quels, par exemple comme antioxydants, ou bien 20 pourront être utilisés comme précurseurs de vanilline dans des procédés de bioconversion tels que ceux décrits dans la Demande EP 0 453 368 ou la Demande PCT WO/96/08576).

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se 25 réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé conforme à l'Invention.

Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune 30 manière une limitation.

**EXEMPLE 1 : ACTIVITÉ ENZYMATIQUE D'A. NIGER I-1472 CULTIVÉ SUR PULPE DE BETTERAVE :**

**A) Réalisation des cultures d'*Aspergillus niger* I-1472**

La souche d'*Aspergillus niger* déposée le 31 35 Août 1994 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes, sous le numéro I-1472, a été mise en

culture en présence de co-produits agricoles ou de leurs fractions comme sources carbonées inductrices d'enzymes d'intérêt.

La composition du milieu de culture est la suivante :

Source carbonée inductrice	15,00 g/L
Maltose	2,50 g/L
Tartrate diammonium	1,842 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,20 g/L
$\text{CaCl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,0132 g/L
$\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,50 g/L
Extrait de levure	0,50 g/L
Tween 80	0,50 g/L

De la pulpe de betterave est utilisée comme source de carbone inductrice.

La composition de la pulpe de betterave (poids sec) est la suivante :

Rhamnose	24 mg/g
Arabinose	209 mg/g
Xylose	17 mg/g
Galactose	51 mg/g
Glucose	211 mg/g
Acides uroniques	211 mg/g
Acide férulique	8 mg/g
Protéines	113 mg/g
Cendres	36 mg/g

Une culture témoin est réalisée sur maltose (20 g/L) comme seule source de carbone. Le milieu est stérilisé par autoclavage 20 minutes à 120°C. Les cultures se déroulent en fioles de 500 mL contenant 200 mL de milieu. L'inoculation est effectuée par des conidiospores ( $2,10^5$  spores/mL). Après inoculation, les cultures sont incubées à 30°C et soumises à une agitation de 120 tours/minute.

La production d'enzymes au cours de la culture est suivie par le dosage des activités enzymatiques

produites. Pour procéder à ce dosage, un aliquot du milieu de culture d'environ 10 mL est prélevé stérilement chaque jour. Cet aliquot est ensuite filtré sur fibres de verre, et les activités enzymatiques vis-à-vis de différents substrats sont dosées.

## **B) Dosage des activités enzymatiques**

### **1) Enzymes de dépolymérisation**

Les activités enzymatiques sont mesurées sur différents polysaccharides purs : galacturonane, carboxyméthylcellulose, xylane, galactane de type I, arabinane, rhamnogalacturonane.

Le milieu réactionnel contient 0,9 mL de solution de substrat à 1 g/L dans le tampon acétate 50 mmol/L pH 4,5 et 0,1 mL de filtrat de culture. Le mélange est incubé 10 minutes à 40°C. Les extrémités réductrices libérées sont dosées en microplaques par le sulfate de cuivre [NELSON, J. Biol. Chem. 153, 375-380 (1944) ; STURGEON, Methods in Plant Biochemistry, 2, 1-37 (1990)]. L'ose constitutif du polysaccharide est utilisé comme standard : acide galacturonique pour les dosages sur galacturonane et rhamnogalacturonane, glucose pour les dosages sur carboxyméthylcellulose, xylose pour les dosages sur xylane, galactose pour les dosages sur galactane et arabinose pour les dosages sur arabinane.

### **2) Activités osidases**

Les activités osidases sont mesurées sur *para*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside et *para*-nitro-phényl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (SIGMA).

Le milieu réactionnel contient 0,1 mL de solution de substrat à 4 mmol/L dans le tampon acétate 50 mmol/L pH 4,5 et 0,1 mL de filtrat du surnageant de culture. Le mélange est incubé 20 minutes à 40°C. 0,6 mL de carbonate de sodium sont alors ajoutés pour inhiber l'activité enzymatique et permettre le développement de la réaction colorimétrique. La concentration en *para*-

nitrophénol libéré est calculée à partir de la densité optique du mélange lue à  $\lambda = 400 \text{ nm}$ .

### 3) Activités férulate estérase

Les activités des férulate estérases sont mesurées sur différents oligomères féruloylés : 5-O-(transféruloyl)-L-Araf (détermination de l'activité FA) et O- $\beta$ -D-Xyl $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)-[5-O-(transféruloyl)- $\alpha$ -L-Araf] (détermination de l'activité XFA) isolés de son de maïs [SAULNIER et al., Carbohydrate Research, 272, 241-253, (1995)], et [2-O-(transféruloyl)- $\alpha$ -L-Araf (détermination de l'activité FA<sub>2</sub>) isolés de pulpe de betterave [KROON et al., Carbohydrate Research, 300, 351-354, (1997)]. Le dosage est effectué à l'optimum des activités spécifiques des autres enzymes.

Le milieu réactionnel contient 100  $\mu$ l de solution de substrat à 70 nmoles/L, 80  $\mu$ l de tampon MOPS (3-N-morpholino-propane sulfonique) 0,1 mole/L, pH 6, et 20  $\mu$ l de filtrat de culture. Le mélange est incubé 1 heure à 40°C. Aux temps : 0, 15, 30, 45, 60 minutes, 10  $\mu$ l de milieu réactionnel sont prélevés et versés dans du tampon MOPS. Les densités optiques sont lues à 286 et 323 nm.

Le milieu réactionnel contient à la fois de l'acide férulique estérifié et de l'acide férulique libéré par l'enzyme. Leurs quantités respectives sont calculées à partir des densités optiques en utilisant les coefficients d'extinction molaires préalablement déterminés à pH 6 :  $\epsilon_{286} = 14176 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{323} = 10350 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  pour l'acide férulique libre, et  $\epsilon'_{286} = 12465 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon'_{323} = 19345 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  pour l'acide férulique estérifié.

Toutes les activités enzymatiques sont exprimées en nkat/mL, ce qui correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une nmole de produit par seconde et par mL, dans les conditions de pH et de température définies ci-dessus.



### C) Résultats

La production d'enzymes dégradant les polysaccharides pariétaux a été suivie au cours de la culture d'*A. niger* sur pulpe de betterave et au cours de la culture témoin sur maltose. Les activités enzymatiques ont été mesurées comme décrit ci-dessus.

#### 1) Enzymes de dépolymérisation et osidases

Les résultats obtenus pour les enzymes de dépolymérisation et les osidases sont illustrés par la figure 1, qui représente l'activité d'hydrolyse pour chaque substrat testé, en fonction du nombre de jours de culture.

Légende de la Figure 1 :

Figure 1A : Induction sur pulpe de betterave ;

Figure 1B : Induction sur maltose ;

● : Galactane ;

■ : Arabinane ;

▲ : Acide polygalacturonique ;

○ : CarboxyMéthylCellulose ;

□ : Xylane ;

▼ : Rhamnogalacturonane ;

× : pNPGalactoside ;

• : pNPArabinoside.

Lorsque le maltose seul est utilisé comme source carbonée dans les cultures d'*A. niger* I-1472, très peu d'activités enzymatiques actives sur les polysaccharides pariétaux sont libérées. Par contre, la présence de pulpe de betterave comme source carbonée inductrice conduit à une synthèse beaucoup plus importante d'enzymes dégradant les polysaccharides pariétaux. Un large spectre d'enzymes est présent dans le surnageant de culture. D'autre part, la synthèse de ces enzymes est rapide et l'on observe que les activités enzymatiques atteignent leur valeur maximum dès le 3ème jour de culture. Pour cette raison, les activités

férulate estérases ont été recherchées dans les surnageants de culture à 3 jours.

## 2) Férulate estérases

Les activités férulate estérases dans les surnageants de culture sont indiquées dans le Tableau II suivant:

Tableau II

Source carbonée inductrice	Activité (nkat/mL)		
	FA	FAX	FA <sub>2</sub>
Témoin Maltose	0	0	0
Pulpe de betterave	1,1	0,5	0

Une faible activité FA et FAX est donc induite lors de la culture d'*A. niger* I-1472 sur pulpe de betterave.

### **EXEMPLE 2 : ACTIVITÉS ENZYMATIQUES D'*A. niger* I-1472 CULTIVÉ SUR HYDROLYSATS DE PULPE DE BETTERAVE**

La pulpe de betterave subit deux hydrolyses successives par de l'acide trifluoroacétique pour en extraire les oligomères féruloylés, selon le protocole suivant [RALET et al. Carbohydrate Research, 263, 227-241 (1994)] :

800 g de pulpe de betterave sont mélangés à raison de 20 g/L à une solution d'acide trifluoroacétique 50 mmol/L. Le mélange est maintenu à 100°C pendant 1h30. La fraction soluble est recueillie, et précipitée par addition de 4 volumes d'éthanol. La fraction soluble dans l'éthanol est recueillie, et constitue l'hydrolysat 1.

Le précipité est traité par l'acide trifluoroacétique (150 mmol/L) pendant 6 heures à 100°C. La fraction soluble est recueillie, et précipitée par addition de 4 volumes d'éthanol. La fraction soluble dans l'éthanol est recueillie et constitue l'hydrolysat 2.

Les fractions notées : « hydrolysat 1 » et : « hydrolysat 2 » sont obtenues avec des rendements de 280 mg/g pour l'hydrolysat 1 et de 76 mg/g pour

l'hydrolysat 2, et ont les compositions (poids sec) suivantes :

	Hydrolysat :	1	2
	Rhamnose	6 mg/g	54 mg/g
5	Arabinose	535 mg/g	129 mg/g
	Xylose	2 mg/g	2 mg/g
	Galactose	16 mg/g	187 mg/g
	Glucose	85 mg/g	42 mg/g
	Acides uroniques	17 mg/g	188 mg/g
10	Acide férulique	10 mg/g	12 mg/g
	Protéines	12 mg/g	8 mg/g
	Cendres	64 mg/g	86 mg/g

Les hydrolysats 1 ou 2 sont ensuite utilisés comme sources carbonées inductrices dans une culture d'*A. niger* I-1472, et les enzymes produites par le champignon sont mesurées selon les protocoles décrits à l'exemple 1.

#### 1) Enzymes de dépolymérisation et osidases

Les résultats obtenus pour les enzymes de dépolymérisation et les osidases sont illustrés par la figure 2 qui représente l'activité d'hydrolyse pour chaque substrat testé, en fonction du nombre de jours de culture.

Légende de la Figure 2 :

- Figure 2A : Induction sur hydrolysat 1 ;  
 Figure 2B : Induction sur hydrolysat 2 ;
- : Galactane ;
  - : Arabinane ;
  - ▲ : Acide polygalacturonique ;
  - : CarboxyMéthylCellulose ;
  - : Xylane ;
  - ▼ : Rhamnogalacturonane ;
  - × : pNPGalactoside ;
  - : pNPArabinoside.

Lorsque les hydrolysats 1 ou 2 de pulpe de betterave sont utilisés comme sources carbonées inductrices dans les cultures d'*A. niger* I-1472, la

production d'enzymes dégradant les polysaccharides pariétaux est plus faible que dans les cultures sur pulpe de betterave. Les hydrolysats induisent donc la synthèse de quantités plus faibles d'enzymes. D'autre part, on observe que les activités enzymatiques atteignent leur valeur maximale après 4 jours de culture sur l'hydrolysate 1, et après 3 jours sur l'hydrolysate 2.

## 2) Férulate estérases

Les activités férulate estérases ont été mesurées dans les surnageants du 3ème jour de culture pour l'hydrolysate 2, et du 4ème jour de culture pour l'hydrolysate 1. Les résultats sont illustrés par le Tableau III ci-dessous.

Tableau III

Source carbonée inductrice	Activité (nkat/mL)		
	FA	FAX	FA <sub>2</sub>
Témoin Maltose	0	0	0
Hydrolysate 1	0,6	0	0,2
Hydrolysate 2	0	0	0

De faibles activités FA et FA<sub>2</sub> sont induites lors de la culture d'*A. niger* I-1472 sur l'hydrolysate 1 de pulpe de betterave, riche en acide férulique estérifié à l'arabinose.

## EXEMPLE 3 : ACTIVITÉS ENZYMATIQUES PRODUITES PAR *A. niger* I-1472 CULTIVÉ SUR SON DE MAÏS

*A. niger* I-1472 est mis en culture en présence de son de maïs en tant que source carbonée inductrice, et les enzymes produites par le champignon sont mesurées, selon les protocoles décrits à l'exemple 1.

La composition du son de maïs (poids sec) est la suivante :

	Rhamnose	0 mg/g
	Arabinose	154 mg/g
	Xylose	276 mg/g
	Galactose	51 mg/g
5	Glucose	248 mg/g
	Acides uroniques	42 mg/g
	Acide férulique	31 mg/g
	Protéines	50 mg/g

#### 1) Enzymes de dépolymérisation et osidases

10 Les résultats obtenus pour les enzymes de dépolymérisation et les osidases sont illustrés par la figure 3, qui représente l'activité d'hydrolyse pour chaque substrat testé, en fonction du nombre de jours de culture.

15 Légende de la Figure 3 :

- : Galactane ;
- : Arabinane ;
- ▲ : Acide polygalacturonique ;
- : CarboxyMéthylCellulose ;
- 20 □ : Xylane ;
- ▼ : Rhamnogalacturonane ;
- × : pNPGalactoside ;
- : pNPArabinoside.

25 Ces résultats montrent que dans le cas des enzymes de dépolymérisation et des osidases, les activités enzymatiques induites lors de la culture en présence de son de maïs sont plus faibles que celles induites en présence de pulpe de betterave.

#### 2) Férulate estérases

30 Les activités férulate estérases mesurées dans le surnageant après 3 jours de culture sont respectivement de 4,6 nkat/mL pour FA et 4,9 nkat/mL pour FAX. On observe une nette induction des activités FA et FAX par le son de maïs.

**EXEMPLE 4 : ACTIVITÉS ENZYMATIQUES PRODUITES PAR A. NIGER I-1472 CULTIVÉ SUR L'AUTOCLAVAT ISSU DE SON DE MAÏS**

Le son de maïs subit un traitement par autoclavage pour en extraire les oligomères féruloylés  
5 selon le protocole suivant :

Le son est mis en suspension dans l'eau (à raison de 100 g de son par litre), puis autoclavé à 160°C pendant 60 minutes. L'autoclavat est centrifugé pendant 10 minutes à 20 000 t/min, puis filtré sur verre fritté  
10 G3 (taille des pores 15-40 µm ; SCHOTT). Le surnageant filtré est lyophilisé. Le produit final, dénommé ci-après « autoclavat de son de maïs », est obtenu avec un rendement de 600 mg/g et a la composition (poids sec) suivante :

15	Rhamnose	0 mg/g
	Arabinose	208 mg/g
	Xylose	386 mg/g
	Galactose	73 mg/g
	Glucose	39 mg/g
20	Acides uroniques	47 mg/g
	Acide férulique	34 mg/g
	Protéines	8 mg/g
	Cendres	8 mg/g

L'autoclavat est ensuite utilisé comme source  
25 carbonée inductrice pour la culture d'A. niger I-1472 et les enzymes sont mesurées dans le surnageant de culture selon les protocoles décrits à l'exemple 1.

1) Enzymes de dépolymérisation et osidases

Les résultats obtenus pour les enzymes de  
30 dépolymérisation et les osidases sont illustrés par la figure 4 qui représente l'activité d'hydrolyse pour chaque substrat testé, en fonction du nombre de jours de culture.

Légende de la Figure 4 :

- : Galactane ;
- : Arabinane ;
- ▲ : Acide polygalacturonique ;
- 5 ○ : CarboxyMéthylCellulose ;
- : Xylane ;
- ▼ : Rhamnogalacturonane ;
- × : pNPGalactoside ;
- : pNPARabinoside.

10 On constate en particulier que l'activité xylanase induite en présence d'hydrolysats de son de maïs est beaucoup plus élevée que celle induite lorsque le son de maïs natif est utilisé comme source carbonée inductrice.

## 15 2) Férulate estérases

Les activités férulate estérases mesurées dans le surnageant après 5 jours de culture, sont respectivement de 9,7 nkat/mL pour FA et de 10,6 nkat/mL pour FAX ; on observe donc une induction encore plus  
20 importante que celle observée dans le cas des cultures effectuées en présence de son de maïs.

### **EXEMPLE 5 : LIBÉRATION D'ACIDE FÉRULIQUE PAR LES ENZYMES D'*A. niger* I-1472**

Le surnageant de cultures d'*A. niger* I-1472  
25 cultivées en présence de pulpe de betterave comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus, et concentré 20 fois par lyophilisation, a été utilisé comme source d'enzymes pour libérer l'acide férulique présent soit dans la pulpe de betterave soit dans l'autoclavat de son de maïs.

30 Cette libération a été comparée avec la libération d'acide férulique par des enzymes commerciales : SP 584 (NOVO) dans le cas de la pulpe de betterave et NOVOZYM 342 (NOVO) dans le cas de l'autoclavat de son de maïs.

Le Tableau IV ci-dessous illustre la comparaison entre les activités enzymatiques présentes dans les 4 préparations d'enzymes utilisées :

Tableau IV

Substrat	Activité spécifique (nkat/mg)			
	Surnageant d' <i>A. niger</i> I-1472 sur pulpe de betterave	Surnageant d' <i>A. niger</i> sur autoclavat de son de maïs	SP 584	NOVOZYM 342
Arabinane	120,6	1,9	291,1	7,2
Xylane	125,5	93,9	62,2	104,3
Galactane	32,9	1,8	943,9	2,8
Rhamnogalacturonane	53,4	4,9	256,7	nd
CMC	13,6	12,2	4,7	24,9
Acide polygalacturonique	86,0	1,5	2400,2	0,4
pNP-Rha	12,9	nd	0,2	0,0
pNP-Gal	19,8	3,8	84,8	0,0
pNP-Ara	266,6	27,5	619,5	0,3
XFA	9,2	85,9	0,1	0,8
FA	5,8	90,4	0,1	0,2
FA2	2,4	nd	0,3	nd

5 nd : non déterminé

#### **A) Libération de l'acide férulique contenu dans la pulpe de betterave**

La dégradation enzymatique de pulpe de betterave a été réalisée en présence de 10 mg de protéines (SP 584 ou enzymes d'*A. niger* I-1472) par g de pulpe sèche, soit 10 mg de protéines pour 8 mg d'acide férulique estérifié initialement présent dans la pulpe de betterave. Après 24 h d'hydrolyse, la quantité d'acide férulique libéré par SP 584 représente 50% de cette quantité initiale d'acide férulique, et la quantité d'acide férulique libéré par les enzymes d'*A. niger* I-1472 représente 40% de cette quantité initiale. Les enzymes sécrétées par *A. niger* I-1472 sont donc légèrement moins efficaces que SP 584 pour libérer l'acide férulique présent dans la pulpe de betterave.

#### **B) Libération de l'acide férulique contenu dans l'autoclavat de son de maïs**

La dégradation enzymatique de l'autoclavat de son de maïs a été réalisée en présence de 10 mg de



protéines (NOVOZYM 342 ou enzymes d'*A. niger* I-1472) par g d'autoclavat sec, soit 10 mg de protéines pour 34 mg d'acide férulique estérifié initialement présent dans l'autoclavat de son de maïs. Après 24 h d'hydrolyse, la quantité d'acide férulique libéré par NOVOZYM 342 représente 33% de cette quantité initiale d'acide férulique, et la quantité d'acide férulique libéré par les enzymes d'*A. niger* I-1472 représente 95% de cette quantité initiale. Les enzymes sécrétées par *A. niger* I-1472 sont donc beaucoup plus efficaces que NOVOZYM 342 pour libérer l'acide férulique contenu dans l'autoclavat de son de maïs.

**EXEMPLE 6 : BIOCONVERSION DIRECTE DE L'ACIDE FÉRULIQUE PRÉSENT DANS DES CO-PRODUITS AGRICOLES OU LEURS FRACTIONS, EN ACIDE VANILLIQUE PAR *A. niger* I-1472 CULTIVÉ EN PRÉSENCE DE SON DE MAÏS**

*A. niger* I-1472 a été cultivé en présence de son de maïs comme source carbonée inductrice d'enzymes capables de dégrader les polysaccharides pariétaux. La production d'acide vanillique a été suivie en utilisant respectivement l'autoclavat de maïs, la pulpe de betterave ou ses hydrolysats comme substrat végétal source d'acide férulique.

**Conditions de bioconversion d'acide férulique en acide vanillique**

La souche d'*A. niger* I-1472 a été cultivée dans les mêmes conditions de culture que celles décrites préalablement pour la production d'enzymes. Les cultures sont réalisées en bioréacteurs de laboratoire (2 litres de capacité) à agitation mécanique.

A l'optimum de production des enzymes, (en général au 3ème jour d'incubation de la culture), le substrat végétal source d'acide férulique estérifié est ajouté à la culture de *A. niger* I-1472 à raison d'une quantité correspondant à 0,3 à 1,5 g d'acide férulique par litre de culture et par jour.

La bioconversion de l'acide férulique libéré en acide vanillique est suivie par HPLC. L'analyse HPLC s'effectue sur des aliquots du milieu de culture prélevés à intervalles de temps réguliers et filtrés sur fibres de verre.

Les conditions d'analyse sont les suivantes :  
Colonne HPLC MERCK LICHROSPHER 100 RP18 (5 µm, 125 × 4 mm), maintenue à 30°C ; débit de 0,75 mL/minute ; détection UV à 280 nm.

Solvant d'élution : A : 0,01% d'acide acétique dans l'eau ; B : méthanol. Le profil d'élution est le suivant : 20% de solvant B pendant 4 minutes ; gradient linéaire de 20 à 40% de solvant B pendant 24 minutes ; 100% de solvant B pendant 2 minutes ; retour à 20% de solvant B et équilibrage de la colonne pendant 5 minutes.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau V ci-dessous, à l'optimum de production d'acide vanillique à partir des différentes sources d'acide férulique utilisées. La quantité d'acide férulique consommé correspond à la différence entre la quantité totale d'acide férulique ajouté à la culture sous forme de substrat végétal, et la quantité totale d'acide férulique présent dans la culture au moment du dosage (il n'est pas possible de mesurer directement la quantité d'acide férulique libéré, du fait qu'en présence des cellules d'*A. niger*, celui-ci est immédiatement converti en acide vanillique au fur et à mesure de sa libération)

Tableau V

Source d'acide férulique	Quantité totale d'acide férulique lié ajouté à la culture (mg/L)	Quantité d'acide férulique consommé (mg/L)	Acide vanillique produit (mg/L)
Son de maïs natif	600	0	0
Autoclavat de son de maïs	4240	3460	1400 (après 7 jours de culture)
Pulpe de betterave	600	0	0
Hydrolysats 1 de pulpe de betterave	1680	1160	350 (après 6 jours de culture)
Hydrolysats 2 de pulpe de betterave	4240	3730	950 (après 7 jours de culture)

On observe une production maximale d'acide vanillique lorsque les substrats végétaux riches en oligosaccharides féruloylés (hydrolysats de pulpe de betterave et autoclavats de son de maïs) servent de sources d'acide férulique. L'acide férulique est donc libéré par les enzymes induites de *A. niger* I-1472 et immédiatement biotransformé en acide vanillique par les enzymes intracellulaires, à raison de 1400 mg/L en 7 jours avec un rendement molaire de 46% par rapport à l'acide férulique consommé, et de 950 mg/L en 7 jours avec un rendement molaire de 29% par rapport à l'acide férulique consommé, lorsque l'autoclavat de son de maïs et l'hydrolysats 2 (riche en acide férulique estérifié au galactose) sont respectivement utilisés comme source d'acide férulique.

**EXEMPLE 7 : BIOCONVERSION DIRECTE DE L'ACIDE FÉRULIQUE PRÉSENT DANS DES CO-PRODUITS AGRICOLES OU LEURS FRACTIONS EN ACIDE VANILLIQUE PAR *A. NIGER* I-1472 CULTIVÉ EN PRÉSENCE DE PULPE DE BETTERAVE**

Dans cet exemple, la source carbonée inductrice d'enzymes est la pulpe de betterave. Le son de maïs, l'autoclavat de maïs, la pulpe de betterave ou ses hydrolysats 1 ou 2 sont utilisés comme source d'acide férulique.

La production d'acide férulique et d'acide vanillique par *A. niger* I-1472 est suivie comme indiqué à l'exemple 6 ci-dessus.

Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau VI suivant, à l'optimum de production d'acide vanillique à partir des différentes sources d'acide férulique utilisées.

5

Tableau VI

Source d'acide férulique	Quantité totale d'acide férulique lié ajoutée à la culture (mg/L)	Quantité totale d'acide férulique consommé (mg/L)	Acide vanillique produit (mg/L)
Son de maïs natif	600	0	0
Autoclavat de son de maïs	3750	3290	2200 (après 7 jours de culture)
Pulpe de betterave	600	350	50 (après 6 jours de culture)
Hydrolysat 1 de pulpe de betterave	900	650	150 (après 4 jours de culture)
Hydrolysat 2 de pulpe de betterave	900	770	270 (après 4 jours de culture)

Ces résultats montrent que l'utilisation de pulpe de betterave comme source carbonée inductrice conduit à des résultats de bioconversion directe meilleurs que ceux observés dans le cas de l'utilisation du son de maïs comme source carbonée inductrice ; ceci est en accord avec les résultats sur les potentialités des enzymes de *A. niger* I-1472 induites dans ces conditions (exemples 1 et 2). En effet, dans le cas des cultures effectuées en présence de pulpe de betterave l'on observe pour les enzymes de dépolymérisation et les osidases, un spectre d'activités enzymatiques plus large et des niveaux d'activité plus élevés que dans le cas des cultures réalisées en présence de son de maïs ; ceci permet la libération d'une plus grande quantité et d'une plus grande variété d'oligosaccharides féruloylés utilisés comme substrat par les férulate estérases.

D'autre part, une production maximale d'acide vanillique est obtenue lorsque l'autoclavat de son de maïs est utilisé comme substrat végétal source d'acide férulique. Dans les cultures réalisées en présence de pulpes de betterave comme source carbonée inductrice des enzymes de dépolymérisation et des osidases, l'ajout

d'autoclavat de maïs induit en outre les activités férulate estérases.

L'acide férulique libéré par les enzymes induites de *A. niger* I-1472 est ensuite très efficacement biotransformé en acide vanillique par les enzymes intracellulaires, à raison de 2200 mg/L en 7 jours avec un rendement molaire de 77% par rapport à l'acide férulique consommé.

Il est à noter que l'acide férulique lié présent dans les pulpes de betterave et leurs hydrolysats utilisés comme substrat végétal source d'acide férulique a également été bioconverti directement en acide vanillique, bien qu'à un niveau moindre.

**EXEMPLE 8 : BIOCONVERSION DIRECTE DE L'ACIDE FÉRULIQUE PRÉSENT DANS L'AUTOCLAVAT DE MAÏS EN ACIDE VANILLIQUE PAR *A. NIGER* I-1472 CULTIVÉ EN PRÉSENCE D'HYDROLYSATS DE PULPE DE BETTERAVE**

Dans cet exemple, les sources carbonées inductrices d'enzymes sont les hydrolysats 1 et 2 de pulpe de betterave. L'autoclavat de maïs est utilisé comme substrat végétal source d'acide férulique

La production d'acide férulique et d'acide vanillique par *A. niger* I-1472 est suivie comme indiqué à l'exemple 6 ci-dessus.

Les résultats obtenus à l'optimum de production d'acide vanillique sont illustrés par le Tableau VII suivant :

Tableau VII

Source carbonée inductrice	Quantité totale d'acide férulique lié ajoutée à la culture (mg/L)	Quantité totale d'acide férulique consommé (mg/L)	Acide vanillique produit (mg/L)
Hydrolysats 1 (riche en acide férulique estérifié à l'arabinose)	3300	3150	1260 (après 7 jours de culture)
Hydrolysats 2 (riche en acide férulique estérifié au galactose)	3300	3180	1550 (après 7 jours de culture)

La production d'acide vanillique par *A. niger* I-1472 à partir de l'acide férulique contenu dans l'autoclavat de maïs est de 1260 mg/L après 7 jours (soit un rendement molaire de 46% par rapport à l'acide férulique consommé), lorsque l'hydrolysats 1 sert de source carbonée inductrice, et de 1550 mg/L après 7 jours (soit un rendement molaire de 56% par rapport à l'acide férulique consommé), lorsque l'hydrolysats 2 sert de source carbonée inductrice.

## REVENDEICATIONS

- 1) Procédé d'obtention de cultures d'*Aspergillus niger* à large spectre d'activité enzymatique, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en
- 5 culture d'au moins une souche d'*Aspergillus niger* en présence d'au moins une source carbonée inductrice choisie dans le groupe constitué par :
- la pulpe de betterave ou au moins une de ses fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés,
  - 10 susceptibles d'être obtenues par hydrolyse acide ;
  - un son de céréale, notamment de maïs, ou un mélange de sons de différentes céréales, ou au moins une de ses fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés,
  - 15 susceptibles d'être obtenues par autoclavage dudit son ou dudit mélange.
- 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la source carbonée inductrice est présente dans ledit milieu de culture à une concentration comprise entre 1 et 50 g/L et de préférence entre 2,5 et
- 20 30 g/L.
- 3) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la culture d'*Aspergillus niger* comprend au moins la souche CNCM I-1472.
- 25 4) Procédé d'obtention d'une préparation enzymatique à large spectre d'activité, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en œuvre du procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3, et la récupération du surnageant de culture.
- 30 5) Préparation enzymatique, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 4.
- 35 6) Procédé de production d'acide férulique libre à partir d'un substrat féruloylé, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact dudit substrat avec au moins une culture d'*Aspergillus*

*niger* obtenue par le procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3, ou avec au moins une préparation enzymatique selon la revendication 5, dans des conditions permettant la libération de l'acide férulique par les  
5 enzymes présentes dans ladite culture ou ladite préparation enzymatique.

7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le substrat féruloylé est choisi parmi :

- 10 - la pulpe de betterave ou au moins une de ses fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés, susceptibles d'être obtenues par hydrolyse acide ;  
- un son de céréale, notamment de maïs, ou un mélange de sons de différentes céréales, ou au moins une de ses  
15 fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés, susceptibles d'être obtenues par autoclavage dudit son ou dudit mélange.

8) Procédé selon une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que l'on  
20 additionne au milieu de culture d'*Aspergillus niger* une quantité de substrat féruloylé correspondant à 0,1 à 50 g d'acide férulique par litre de milieu de culture.

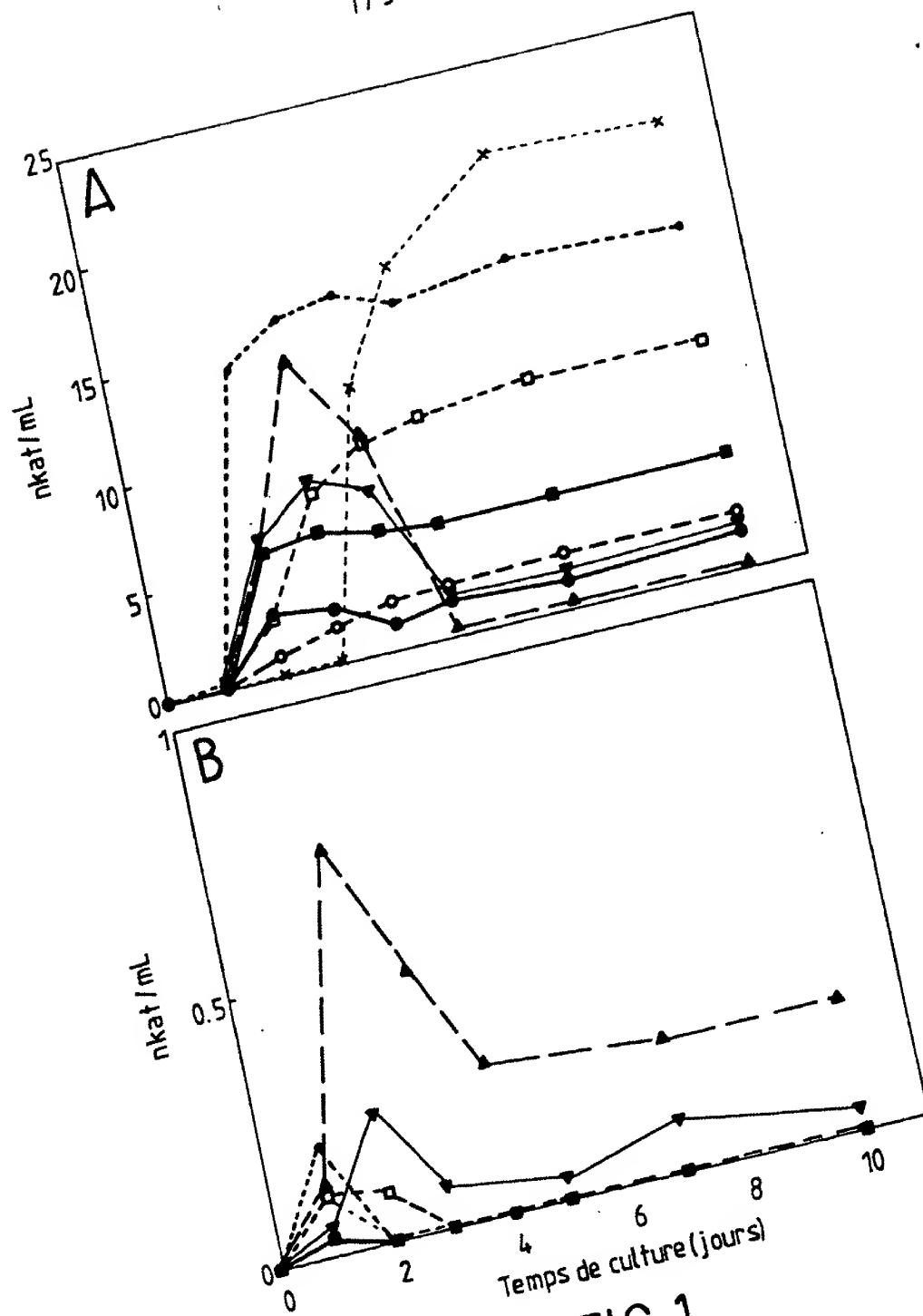
9) Procédé selon une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que l'on mélange  
25 la préparation enzymatique avec une quantité de substrat féruloylé correspondant à 0,1 à 40 g d'acide férulique pour 1 gramme de protéines totales de préparation enzymatique.

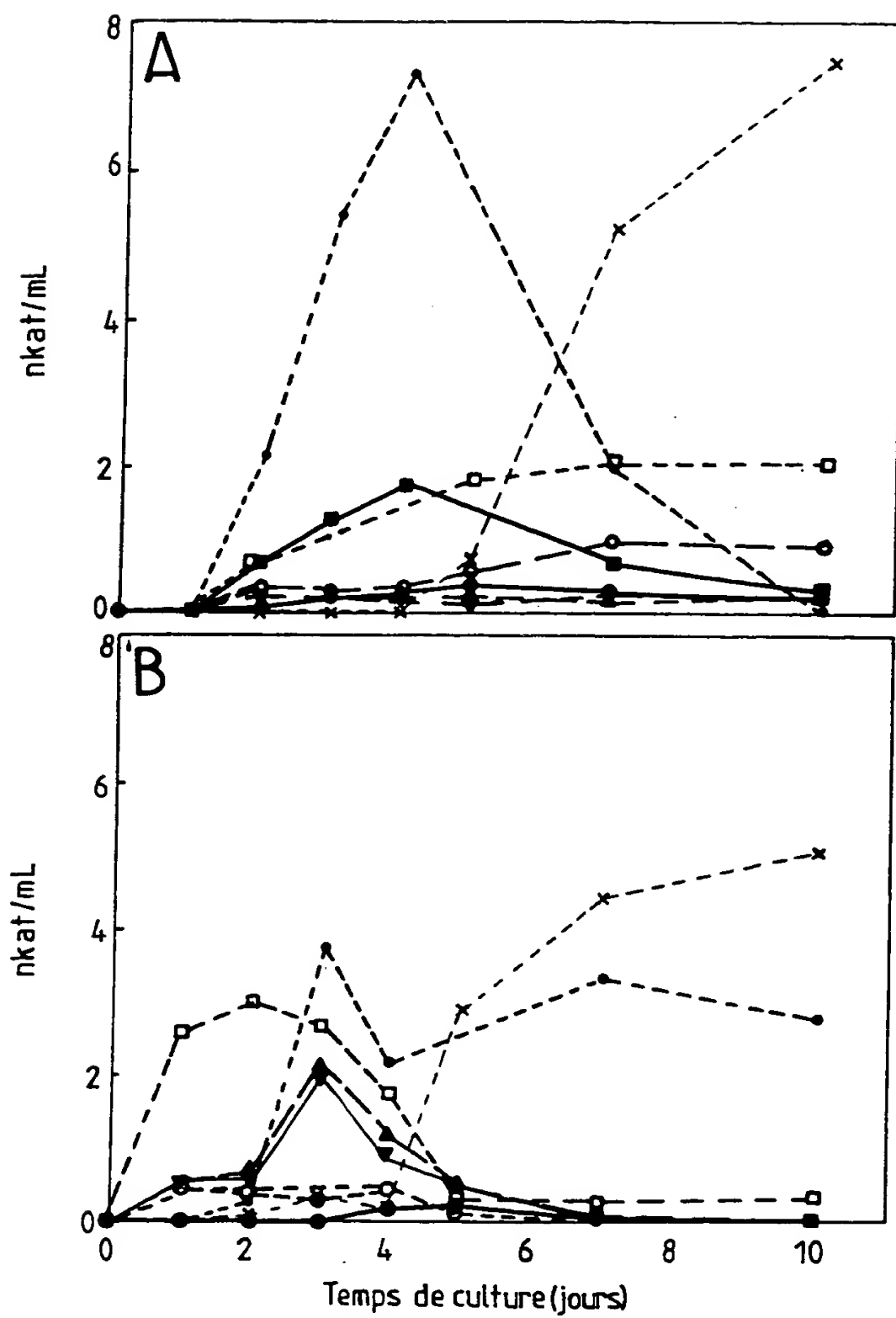
10) Procédé selon une quelconque des  
30 revendications 6 à 9, caractérisé en ce que la culture d'*Aspergillus niger* ou la préparation enzymatique sont produites en présence d'une source carbonée inductrice comprenant de la pulpe de betterave ou au moins une de ses fractions riches en oligosaccharides féruloylés  
35 susceptibles d'être obtenues par hydrolyse acide, et en ce que le substrat féruloylé comprend au moins un son de

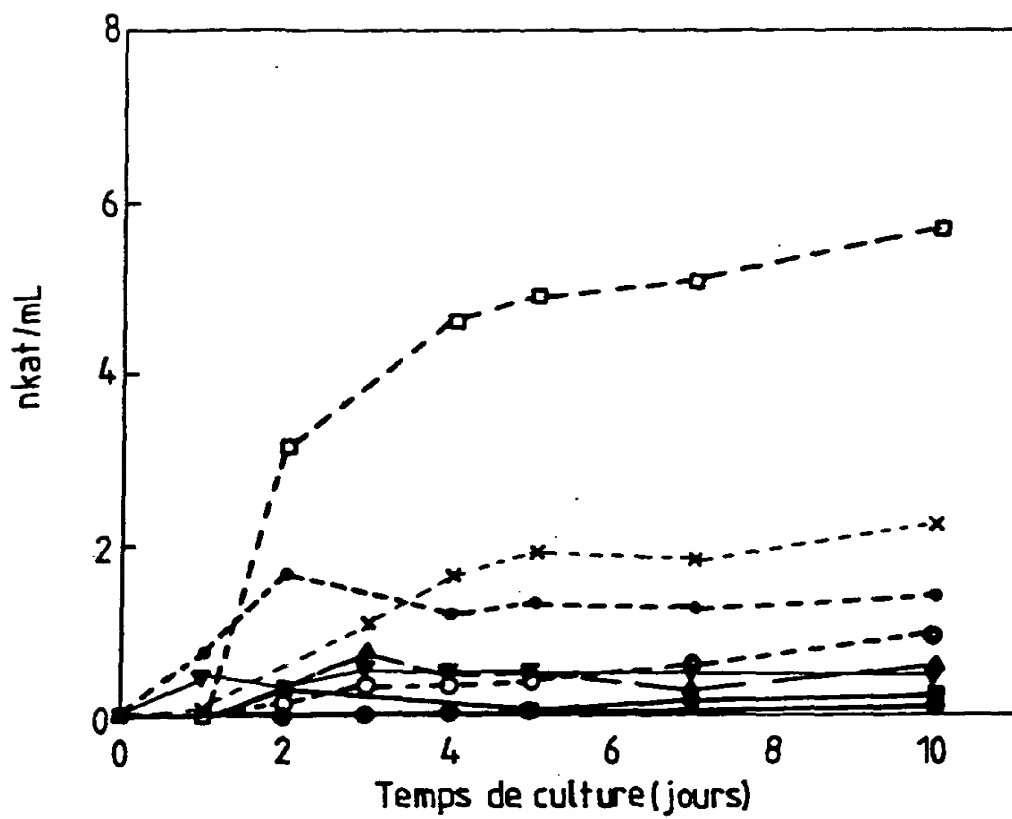
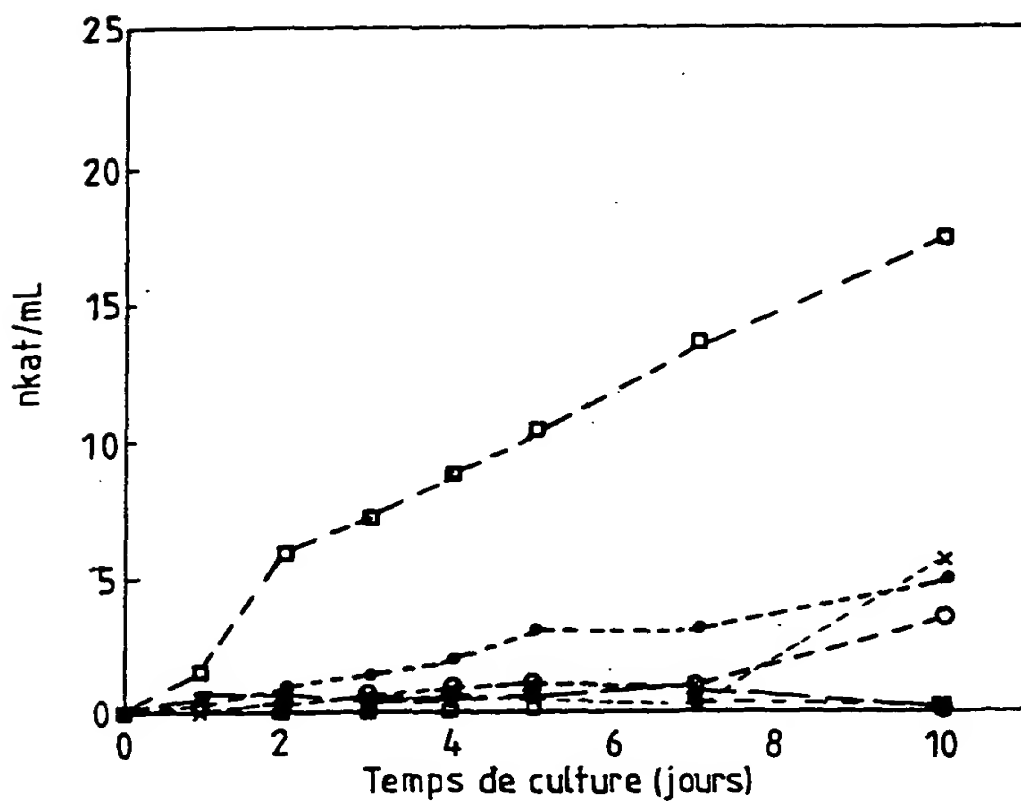


céréale ou au moins une de ses fractions riches en oligosaccharides féruloylés susceptibles d'être obtenues par autoclavage.

- 5 11) Procédé selon une quelconque des revendications 6 à 8, ou 10, caractérisé en ce qu'il comprend en outre la bioconversion directe de l'acide férulique en acide vanillique par la culture d'*Aspergillus niger*.

FIG.1

FIG. 2

FIG.3FIG.4